

• 实验研究 •

动脉栓塞热疗用羰基铁粉磁热效应和细胞毒性研究^{*}江 薇 赵凌云 盛 军 唐劲天^{**}

【摘要】 目的 探讨将羰基铁粉应用于磁感应动脉栓塞加温治疗肿瘤,测定其在交变磁场下升温状况和细胞毒性,初步评价其磁热性和安全性。 方法 分别改变混悬液浓度(10 mg/ml 羰基铁粉 100% 浸提液、10 mg/ml 羰基铁粉 50% 浸提液、64 g/L 苯酚溶液)和磁场电流强度(49.9、79.9、110.2 Oe),测定因浓度和磁场电流强度的变化对羰基铁粉升温的影响。将羰基铁粉浸提液对小鼠 L-929 成纤维细胞培养 2、4、7 d,显微镜下观察细胞形态变化,MTT 法检测计算细胞相对增殖度,用 6 级毒性分类法评级。 结果 羰基铁粉-碘化油混悬液的温度随浓度的升高、磁场强度的增加而升高。浓度为 60 mg/ml 的羰基铁粉-碘化油混悬液在 110.2 Oe 下可以达到理想的治疗温度。细胞毒性检测,小鼠成纤维细胞 L-929 在 10 mg/ml 羰基铁粉 100% 浸提液、10 mg/ml 羰基铁粉 50% 浸提液培养期(培养 2、4、7 d)细胞贴壁生长,形态良好,细胞毒级为 0~1 级。 结论 羰基铁粉在交变磁场下有较好的升温效果,无细胞毒性。

【关键词】 羰基铁粉; 交变磁场; 热疗; 细胞毒性; L-929 细胞

中图分类号:R-332

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2009)06-0487-04

Magneto-heating Effect and Cytotoxicity of Carbonyl Iron Powder in Arterial Embolization Hyperthermia Jiang Wei, Zhao Lingyun*, Sheng Jun, et al. * Institute of Medical Physics and Engineering, Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the magneto-heating effect and cytotoxicity of the carbonyl iron powder as a feasibility for arterial embolization hyperthermia. **Methods** Different doses of carbonyl iron powder suspensions were prepared in vitro (10 mg/ml, 100%; 10 mg/ml, 50%; or 64 g/L phenol solutions), and heated for 20 minutes in an alternating magnetic field (49.9, 79.9, and 110.2 Oe). The influences of the doses of suspensions and currency of magnetic field on the heating effect were observed. Meanwhile, mouse fibroblast L-929 cells were cultured with the suspensions for 2, 4, or 7 days. The morphology and relative growth rate (RGR) of the cells were determined by microscopy and MTT assay. The cytotoxicity of the suspensions was then classified. **Results** The heating ability of the carbonyl iron powder increased with the suspension concentration and the strength of the magnetic field. A optimal therapeutic temperature was achieved at 110.2 Oe with 60 mg/ml carbonyl iron powder suspension. The L-929 cells showed normal morphology after been treated by the carbonyl iron powder (10 mg/ml 100% solution and 50% solution) for 2, 4 and 7 days with the 0-1 degree cytotoxicity. **Conclusion** The carbonyl iron powder has good heating effect under the alternating magnetic field, and is compatible with the tested cells.

【Key Words】 Carbonyl iron powder; Alternating magnetic field; Hyperthermia; Cytotoxicity; L-929 cells

动脉栓塞热疗是指是应用栓塞介质经微导管经动脉注入肿瘤部位,对由动脉供给的肿瘤进行选择性的栓塞,然后再对肿瘤施以热疗的双重治疗方法^[1],具有微创、靶向效应、可以反复多次治疗等优点。目前,应用于动脉栓塞热疗的介质主要有热碘化油^[2]、磁颗粒(如 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4)等。用热碘化油作为栓塞介质,磁颗粒经动脉灌注后,会形成聚集物,肿瘤部位浓度远远高于邻近的正常组织,并且大多不会被清除^[3,4]。利用这个特性,就可将病患反复置于磁场下进行热疗,免去多次注射给病人带来的痛苦。

相关研究还表明,动脉栓塞的介质需要选择粒径在微米级的微球,这样才能确保它们可以阻塞肿

瘤的毛细血管床,而不会通过毛细血管进入静脉循环^[5]。美国 International Specialty Products (ISP) 公司的羰基铁粉(Carbonyl Iron Powder),粒径 1 μm 左右(图 1),经美国药品监督管理局批准,可以直接添加到食品中作为铁元素补给,而且羰基铁粉不会造成铁元素摄入过量中毒^[6]。现在我们拟利用它的这种特性,将其作为动脉栓塞热疗的介质,对羰基铁粉-碘化油的混悬液在体外产热的行为和对细胞的毒性进行研究。L-929 成纤维细胞是目前细胞毒性试验中应用最早及使用最广的细胞,具有传代稳定、繁殖迅速、体外培养条件低、能为许多材料细胞毒性所共用等优点,1982 年美国质量标准协会将 L-929 成纤维细胞推荐为细胞毒性试验中的标准细胞^[7]。

* 基金项目:国家自然科学基金(10775085);国家自然科学基金(30571779);北京市科委(Z07000200540704);清华大学裕元基金

** 通讯作者

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院微生物与生化药理学系(江薇);100084 清华大学工程物理系 医学物理与工程研究所 粒子技术与辐射成像教育部重点实验室(赵凌云、唐劲天);130062 长春生物制品研究所(盛军)

本研究拟利用 L-929 细胞对羰基铁粉体外的细胞毒性进行检测,采用 6 级毒性分类法评级,为将来的体内实验奠定基础。

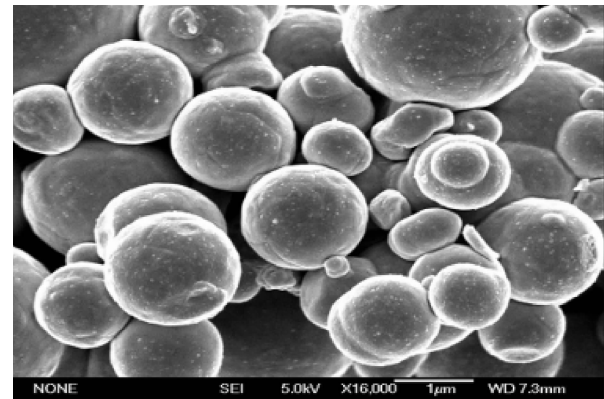


图 1 电镜下的羰基铁粉粒子,粒径在 1 μm 左右

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 微米级羰基铁粉的预处理 羰基铁粉购自美国 ISP 公司。蒸馏水、无水乙醇分别清洗 3 次, 121 $^{\circ}\text{C}$, 33 MPa 蒸汽灭菌,烘干备用。

1.1.2 细胞株 小鼠 L-929 成纤维细胞,由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

1.1.3 实验试剂 碘化油(加柏,法国);RPIM-1640 培养液(主要含 1640 培养基 100 g/1000 ml, GIBCO,美国;青霉素、链霉素各 100 U/ml;10% 胎牛血清,由 SIGMA 公司提供);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH 7.2);0.25% 胰酶消化液(北京拜尔迪生物制品有限公司);MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,北京拜尔迪生物制品有限公司];二甲基亚砷(DMSO,北京北化精细化学品有限责任公司);苯酚溶液(64 g/L)。

1.1.4 实验器械 ①加热设备:带有恒温夹套的小型磁感应实验装置;测温设备:IT-18 型(铜-康铜)热电偶测温探头,Physitemp 公司。②温度显示设备:四通道毫伏计,型号 XS01A-4,北京昆仑天辰仪表科技有限公司,热电偶测温信号由数显仪通过计算机接口输入计算机,进行温度数据的实时记录。③680 型酶联免疫检测仪;超净工作台(ESCO 科技有限公司);细胞培养箱;96 孔培养板;微量加样器(吉尔森精密移液器服务中心);电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 羰基铁粉-碘化油混悬液在外加交变磁场下升温状况的测定 ①羰基铁粉-碘化油混悬液的制备:称取 30、40、50、60、70 mg 羰基铁粉,分别置于 1 ml 离心管中,每个离心管中各加入 1 ml 碘化油,超声混合 5 min,再用 1 ml 微量加样器反复抽提,直至羰基铁粉与碘化油形成均匀的混悬液。②浓度对

羰基铁粉-碘化油混悬液升温状况的影响:将不同浓度羰基铁粉-碘化油混悬液置于小型磁感应实验装置的恒温夹套中,将 2 根热电偶一根插入离心管中,检测混悬液温度,另一根插入恒温夹套中,检测环境温度。设置磁场电流强度为 110.2 Oe,控制环境温度在 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右,记录不同浓度混悬液的升温状况。③磁场强度对羰基铁粉-碘化油混悬液升温状况的影响:将浓度为 60 mg/ml 的羰基铁粉-碘化油混悬液按照上述实验方法,分别检测混悬液在磁场电流强度为 49.9、79.9、110.2 Oe 下的升温状况。

1.2.2 羰基铁粉体外细胞毒性的测定 ①羰基铁粉浸提液的制备:我国国家标准 GB/T16886.521997(医疗器械生物学评价标准第 5 部分:细胞毒性试验体外法)^[8]规定材料表面积与浸提介质体积比应于 0.5~6 cm^2/ml 。将羰基铁粉用 RPIM-1640 培养液浸提,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱浸提 24 h。②细胞培养和 MTT 法检测:将 L-929 细胞进行体外培养,经过传代达到生长情况稳定。取对数生长期的该细胞,0.25% 胰酶消化后制成细胞悬液,以 1×10^4 个/ml 的细胞浓度接种于 96 孔培养板(200 μl /孔, $n=8$),每孔接种 2×10^3 个细胞,置于 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 48 h。观察细胞贴壁良好,弃去原培养液,每块培养板按阴性对照,不同组别实验组,阳性对照,空白对照划区分组换液,每组 8 孔。实验分组具体如下:a. 阴性对照组(1640 培养基);b. 10 ml-100% 浸提液组(10 mg/ml 羰基铁粉 100% 浸提液);c. 10 ml-50% 浸提液组(10 mg/ml 羰基铁粉 50% 浸提液);d. 阳性对照组(64 g/L 苯酚溶液),常规放置于 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。将培养 2、4、7 d 的细胞(每 2 天换液 1 次)进行 MTT 法检测。在 96 孔板细胞培养孔中加入 5 mg/ml MTT(50 μl /孔)后继续培养 4 h,弃去原液加入 DMSO 150 μl /孔,震荡培养板 15 min,待蓝紫色结晶溶出后使用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长测定各孔的吸光度值(OD 值)。

1.2.3 细胞毒性评价 根据所测定的各组 OD 值按照下列公式分别计算各实验组细胞相对增殖度(relative growth rate, RGR)。按照表 1 将各组的 RGR 转换成 6 级细胞毒性以评定材料的毒性程度。

$\text{RGR} = \text{实验组平均 OD 值} / \text{阴性对照组平均 OD 值} \times 100\%$

表 1 相对增殖度与毒性分级转换表 ^[8]	
细胞毒级	细胞相对增殖度(%)
0 级	≥ 100
1 级	75~99
2 级	50~74
3 级	25~49
4 级	1~24
5 级	0

实验结果为 0 或 1 级反应为合格;实验结果为 2 级反应应结合细胞形态分析综合评价;实验结果

为 3~5 级反应为不合格。

2 结果

2.1 羰基铁粉-碘化油混悬液在外加交变磁场下升温状况的测定

①浓度对羰基铁粉-碘化油混悬液升温状况的影响:在磁场电流强度为 110.2 Oe 时,羰基铁粉-碘化油混悬液随着浓度的升高,升温越明显(图 2),在磁场下所能达到的最高温度越高(图 3)。通过对各浓度混悬液在上升期(3 min)和平台期(10 min)的温度作直线并进行线性回归和相关分析,可以看出羰基铁粉在升温过程中和达到最高温度时,混悬液浓度和其所对应的温度成正直线相关关系(3 min 时: $P=0.0059$;10 min 时: $P=0.0040$),且线性关系较好(3 min 时: $r=0.943$;10 min 时: $r=0.956$)(图 4)。

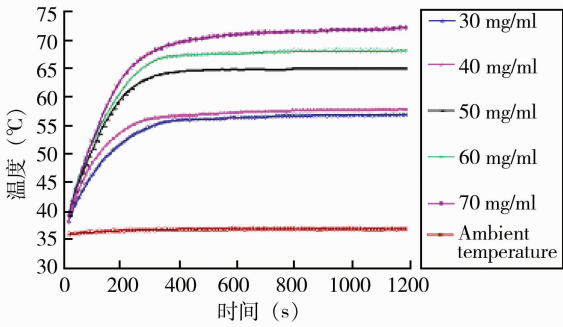


图 2 不同浓度羰基铁粉-碘化油混悬液在磁场电流强度为 300 A 时的升温状况

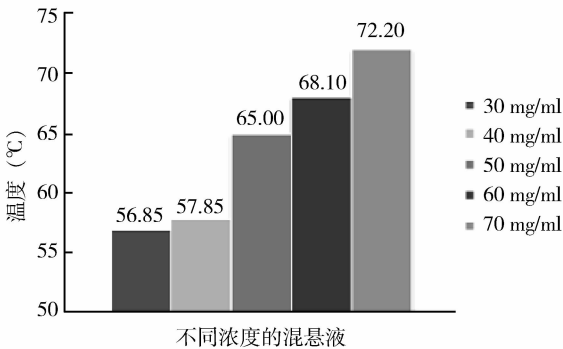


图 3 不同浓度羰基铁粉混悬液在磁场电流强度为 300 A 时最高温度

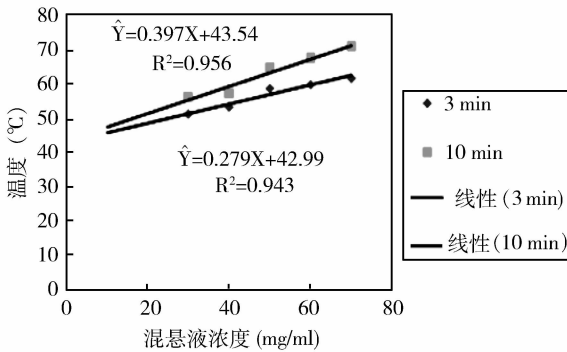


图 4 羰基铁粉-碘化油混悬液升温与剂量的相关性

②磁场强度对羰基铁粉-碘化油混悬液升温状况的影响:如图 3 所示,羰基铁粉-碘化油混悬液浓度为 60 mg/ml 时,随着磁场强度的增加,混悬液升温更加明显,并且在 110.2 Oe 的电流强度下,混悬液所能达到的最高温度明显高于在 79.9 Oe 和 49.9 Oe 电流强度下的最高温度(图 5)。

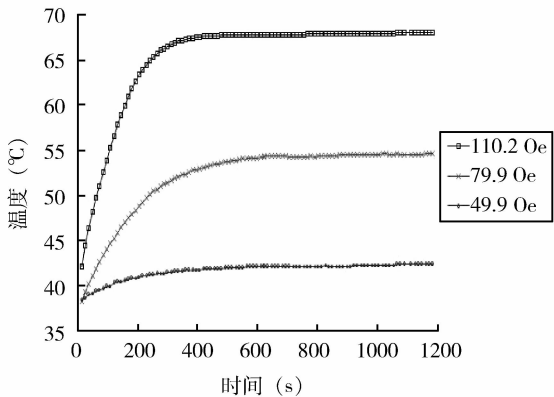


图 5 60 mg/ml 羰基铁粉-碘化油混悬液在不同磁场强度下的升温状况

2.2 羰基铁粉体外细胞毒性的测定

①倒置相差显微镜下细胞形态观察:分别在 MTT 测试前(细胞传代后培养的 2、4、7d)对细胞的形态及增殖情况观察,随着培养时间的延长,细胞数量明显增多,各组分及不同浓度分组的细胞生长与阴性对照组镜下观察并无明显差异,阳性对照组细胞死亡(图 6)。

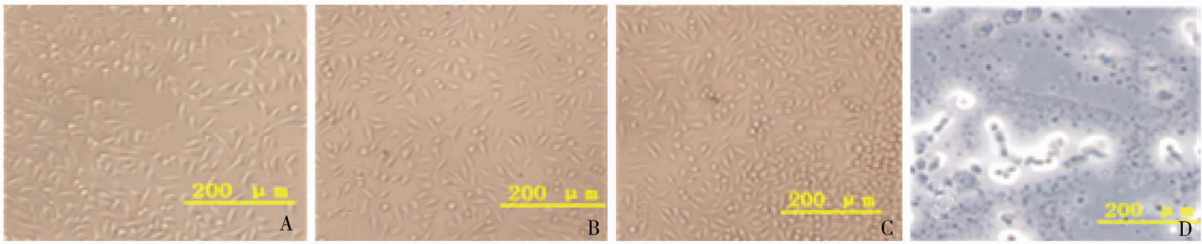


图 6 A~D 分别为 100 倍倒置显微镜下观察到阴性对照组,10 mg/ml-100% 浸提液组,10 mg/ml-50% 浸提液组,阳性对照组的 L-929 细胞。不同浓度分组(B、C)的细胞生长与阳性对照组(A)在镜下观察并无明显差异,多为梭形,阳性对照组细胞全部死亡

②MTT 法测定 OD 值,计算细胞增殖度及细胞毒级,见表 2~4。

表 2 各组培养 2 d 的 OD 值、细胞增殖度及细胞毒级($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	吸光度 (OD)	细胞增殖度 (%)	细胞毒级
10mg/ml - 100% 浸提液组	0.773 \pm 0.097	81.88	1
10mg/ml - 50% 浸提液组	0.952 \pm 0.176	100.8	0
阴性对照组	0.943 \pm 0.176	100	0
阳性对照组	0	0	5

表 3 各组培养 4 d 的 OD 值、细胞增殖度及细胞毒级($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	吸光度 (OD)	细胞增殖度 (%)	细胞毒级
10mg/ml - 100% 浸提液组	1.562 \pm 0.213	91.62	1
10mg/ml - 50% 浸提液组	1.659 \pm 0.266	97.3	1
阴性对照组	1.705 \pm 0.306	100	0
阳性对照组	0	0	5

表 4 各组培养 7 d 的 OD 值、细胞增殖度及细胞毒级($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	吸光度 (OD)	细胞增殖度 (%)	细胞毒级
10mg/ml - 100% 浸提液组	2.212 \pm 0.508	90.25	1
10mg/ml - 50% 浸提液组	2.510 \pm 0.506	102.44	0
阴性对照组	2.450 \pm 0.306	100	0
阳性对照组	0	0	5

3 讨论

动脉栓塞热疗作为磁性靶向热疗的一个分支,现在使用的介质主要为 Fe_2O_3 ^[9] 或 Fe_3O_4 ^[10],多为纳米级粒子或是经高分子包裹后的微米级粒子。本试验将微米级材料羰基铁粉末作为研究对象,对其在交变磁场下升温和在体外对细胞毒性进行研究。

将不同浓度的羰基铁粉-碘化油混悬液置于交变磁场下,当磁场电流一定时,混悬液升温速率随浓度的增加而增加;当混悬液浓度一定时,混悬液升温速率随着磁场电流强度的增加而增加,并且当混悬液浓度为 60 mg/ml,外加交变磁场强度为 110.2 Oe 时,混悬液所能达到的温度(68.10℃)是临床上较为理想的治疗温度。通过对各浓度混悬液在上升期(3 min)和平台期(10 min)的温度进行线性回归和相关分析,可以看出混悬液在进入平台期前浓度与温度呈较好的线性相关关系(图 4),这说明我们可以通过控制混悬液浓度来实现加温的控制。体外细胞毒性实验是一类在离体状态下模拟生物体生长环境,检测医疗器械和材料接触机体组织后生物学反应的体外实验,能在短期内检测出材料对细胞新陈

代谢功能的影响,对毒性物质具有快速筛选作用,是目前公认的鉴定并筛选具有良好生物相容性材料的一种方法。本实验选用的 MTT 法,是一种国际标准检测细胞存活和生长的方法,其原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物,并沉积在活细胞中,而死亡细胞对 MTT 不起作用,因此,死亡细胞不会被染色。由于 MTT 结晶物形成量与细胞数呈正比,OD 值就能间接反映活细胞数量。通过计算出不同浓度试验材料浸提液作用下的细胞增殖度,可以对该材料的细胞毒性作用作出可靠的定量评价。

本研究对不同浓度的羰基铁粉浸提液分别进行了细胞毒性评价(表 2~4)。用不同浓度的羰基铁粉浸提液对小鼠成纤维细胞 L-929 进行培养,在第 2、4、7 天,100% 浸提液组培养细胞毒级均为 1 级(合格),50% 浸提液组培养细胞毒级分别为 0 级或 1 级。由此可以说明本试验所检测的羰基铁粉基本无细胞毒性作用,具有良好的细胞相容性,符合生物体应用的基本要求,初步证实了该材料具有人体应用的生物安全基础,但由于体外实验本身的局限性,在将新材料应用于临床前应进行系统性的实验研究,而不能根据某方面或某个水平的结果就得出生物相容性的结论,对该材料的客观评价也将有赖于从细胞到动物实验结果的综合评价。

参考文献

- 1 Deger S, Taymoorian K, Boehmer D, et al. Thermoradiotherapy using interstitial self-regulating thermoseeds: an intermediate analysis of a phase II trial. Eur Urol, 2004, 45(5): 574-580.
- 2 何玉,张孟增,周建峰,等.热碘油栓塞治疗少血供肝癌.中国介入影像与治疗学,2005,5: 973-974.
- 3 Moroz P, Metcalf C, Gray BN. Histologic analysis of liver tissue following hepatic arterial infusion of ferromagnetic particles in a rabbit tumor model. Biometals, 2003, 16:455-464.
- 4 Moroz P, Jones SK, Cecily M, et al. Hepatic clearance of arterially infused ferromagnetic particles. Int J Hyperthermia, 2003, 19(1): 23-34.
- 5 Jones SK, Winter JG. Experimental examination of a targeted hyperthermia system using inductive heated ferromagnetic microspheres in rabbit kidney. Phys Med Biol, 2001, 40:385-398.
- 6 羰基铁粉的基本用途.中国粉体工业,2007,3:40-41.
- 7 Richardson RR, Miller JA, Reichert WM. Polyimides as biomaterials: preliminary biocompatibility testing. Biomaterials, 1993,14(8):627-635.
- 8 中华人民共和国国家标准 GB/T16886.10-2005《医疗器械生物学评价第 5 部分:体外细胞毒性试验》.
- 9 Jones SK, Winter J, Gray BN. Treatment of experimental rabbit liver tumors by selectively targeted hyperthermia. Int J Hyperthermia, 2002, 18:117.
- 10 杨正强,王建华,王煦漫,等.纳米超顺磁性碘油肝动脉栓塞热疗 VX2 兔肿瘤的实验研究.中华放射学杂志,2006,40(8):870-874.

(收稿日期:2008-09-16)
(修回日期:2009-03-11)
(责任编辑:李贺琼)